DOI:10.11931/guihaia.gxzw202409002

丹霞小花苣苔叶片离体培养与植株再生技术研究

韩伟[1]，常圣鑫[1]，麦广威[1]，曾晓妍[1]，陈再雄[3]，凡强[2*]，于白音[1*]

（1. 韶关学院广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室/生物与农业学院，广东 韶关 512005；2. 中山大学 生命科学学院//广东省植物逆境生物学重点实验室，广州 510275；3. 韶关市丹霞山管理委员会，广东 韶关 512300）

摘　要：丹霞小花苣苔（*Primulina danxiaensis*）为丹霞地貌特有种，隶属于苦苣苔科，分布狭窄，数量稀少，需要利用植物组织培养技术进行扩繁保育。该文以丹霞小花苣苔叶切片为外植体，通过筛选适宜的 $HgCl_2$ 表面消毒时间、不定芽诱导、芽增殖及生根的培养基和组培苗的移栽基质，建立其组培快繁技术体系。结果表明：（1）外植体适宜的消毒条件为75%酒精消毒 30 s+0.1% $HgCl_2$ 消毒 6 min，接种存活率达到 84.95%。（2）不定芽诱导的培养基为 1/2 MS+6-BA 2 $mg \cdot L^{-1}$+NAA 0.1 $mg \cdot L^{-1}$，芽诱导率为 100%，40 d 后平均叶片芽数达到 38.35。（3）芽增殖培养基为 1/2 MS+6-BA 3 $mg \cdot L^{-1}$+NAA 0.2 $mg \cdot L^{-1}$，50 d 后芽增殖系数达到 7.54。（4）生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.5 $mg \cdot L^{-1}$，30 d 后生根率为 100%，单株生根数达到 26.28。（5）组培苗移栽到喀斯特地貌的腐叶土+珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1:1），泥炭土+珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1:1），和珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1）3 种基质上成活率达到 100%，生长良好，无明显差异。该研究可实现丹霞小花苣苔的大量繁殖，有助于其保护和开发利用。

关键词：丹霞小花苣苔，叶片，离体培养，不定芽，植株再生

中图分类号：Q94　　　　　　**文献标识码**：A

In vitro culture and plant regeneration from the leaves of *Primulina danxiaensis*

HAN Wei[1], CHANG Shengxin[1], MAI Guangwei[1], ZENG Xiaoyan[1],
CHEN Zaixiong[3], FAN Qiang[2*], YU Baiyin[1*]

(1. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Norther Region*/*College of Biology and Agriculture*, *Shaoguan University*, Shaoguan 512005, Guangdong, China; 2. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Stress Biology*, *School of Life Sciences*, *Sun Yat-Sen University*, Guangzhou 510275, China; 3. *Administrative Commission of Danxiashan National Park*, Shaoguan 512300, Guangdong, China)

Abstract: *Primulina danxiaensis*, an endemic species of the Danxia landform within the Gesneriaceae family, exhibits a narrow distribution range and a limited population size, thereby necessitating propagation and conservation via plant tissue culture techniques. In this paper, in order to establish the tissue culture and rapid propagation technical system of *P. danxiaensis*, the leaf segments of *P. danxiaensis* were used as explants to screen the appropriate surface disinfection time with $HgCl_2$, the culture media for adventitious bud induction, bud proliferation and rooting, as well as the transplanting substrates for tissue-cultured seedlings. The results were as follows: (1) The optimal disinfection procedure involved a 30-second

---

基金项目：国家公园建设专项资金（2021GJGY034）；国家中医药管理局项目（GZY-KJS-2018-004）；广东省教育厅项目（2106KZDXM010）；韶关市科技计划项目（220607104530687）；韶关学院“粤北特色南药资源开发利用研究科研团队”项目（韶院 [2023] 74 号）；韶关学院农业重点学科项目（韶院 [2023] 73 号）。

第一作者：韩伟(1983—)，硕士，实验师，主要从事植物细胞工程与育种的研究，(E-mail)hanwei8210@sina.com。

*__通信作者__：于白音，博士，教授，主要从事药用植物资源开发利用的研究，(E-mail)540391135@qq.com；凡强，博士，副教授，主要从事植物系统分类学及植物地理学的研究，(E-mail)fanqiang@mail.sysu.edu.cn。

immersion in 75% alcohol, followed by a 6-minute soak in 0.1% $HgCl_2$, achieving an 84.95% survival rate of leaf explants. (2) For bud induction, the most effective medium was found to be 1/2MS supplemented with 6-benzyladenine (6-BA) 2 mg·L^{-1} and α-naphthalene aceticacid (NAA) 0.1 mg·L^{-1}, resulting in a 100% bud induction rate and an average of 38.35 buds per leaf explant after 40 days of culture. (3) Bud proliferation was optimally achieved on 1/2MS medium containing 6-BA 3 mg·L^{-1} and NAA 0.2 mg·L^{-1} , yielding a proliferation coefficient of 7.54 over a 50-day period. (4) Rooting was successfully induced using 1/2MS medium supplemented with NAA 0.5 mg·L^{-1} , leading to a 100% rooting rate and an average of 26.28 roots per plant after 30 days. (5) The tissue-cultured seedlings were successfully acclimatized and transplanted into three different mixed substrates: a mixture of leaf mould from Karst landform, perlite, and vermiculite (1:1:1, *V/V/V)*, peat soil, perlite, and vermiculite (1:1:1, *V/V/V*), and perlite and vermiculite (1:1, *V/V*), all with a 100% survival rate and demonstrating robust growth. This study is capable of achieving large-scale propagation of *P. danxiaensis*, a result that significantly contributes to both its resource protection and utilization.
Key words: *Primulina danxiaensis*, leaves, *in vitro* culture, adventitious bud, plant regeneration

丹霞小花苣苔（*Primulina danxiaensis*）隶属于苦苣苔科（Gesneriaceae），原为小花苣苔属（*Chiritopsis*），后经分类学修订，被并入报春苣苔属（*Primulina*）（Wang et al., 2011; Weber et al., 2011），是一种多年生草本植物，其植株高 2~10 cm，根状茎长 5~15 mm，花白色，花期为 5—6 月，该物种于 2010 年首次被报道，对环境要求较高，一般生长于海拔 100~250 m 大岩石裂缝中，靠近浅池塘、湿坑或阴暗洞穴，常与苦苣苔科旋蒴苣苔、凤尾蕨科剑叶凤尾蕨、荨麻科赤车、鳞始蕨科圆叶鳞始蕨和禾本科淡竹叶等小型植物伴生（Shen et al., 2010）。目前，仅分布于丹霞地貌区域，在广东丹霞山存在 12 个居群，每个居群包含 50~70 个体，其中包括 10~20 株幼苗，在湖南永兴，江西宁都和兴国有 3 个居群（张贵志和喻勋林，2012；田径等，2014），植株约 800 株。Chen 等（2021）运用简化基因组测序（RAD-seq）技术对采自丹霞山 12 个居群的 104 个丹霞小花苣苔个体进行了遗传多样性分析，研究表明丹霞小花苣苔属于极小种群物种，具有很强的遗传结构，应对每个现存种群采取措施进行保护。

报春苣苔属是我国苦苣苔科最大的属，在全球范围内约有 230 多种，其中我国分布有 210 多种（马虎生等，2025），该属植物有较高的园林开发应用前景，同时还有很多药用价值，有消炎止痛、散瘀消肿，解蛇毒等功效（王宁等，2023；罗彭等，2023)。但其分布狭窄，生境特殊，一旦生境被破坏很难生存，因此其种质资源亟待保护（宁祖林，2017）。丹霞小花苣苔作为报春苣苔属植物之一，其花色艳丽，花朵精致，具有良好的观赏价值，适合于室内小盆栽培或园林盆景点缀。华南国家植物园宁祖林等人将采自丹霞山的短序唇柱苣苔为父本，与丹霞小花苣苔为母本进行杂交，成功培育出“紫霞”报春苣苔，并于 2014 年获国际新品种登录。开展丹霞小花苣苔人工繁殖的研究对报春苣苔属植物种质资源的保护和开发利用具有重要的现实意义。

在自然条件下，丹霞小花苣苔主要依靠种子进行繁殖，但其种子较小，收集难度大，限制了人工播种繁殖的开展。报春苣苔属植物能够采用扦插繁殖方式，针对不同浓度的植物生长调节剂的处理效果、扦插方式及扦插基质等影响扦插的关键因素已开展相关研究（戚华沙等，2018；闫海霞等，2019a，2020），但扦插繁殖仍存在繁殖系数低、受季节影响，需要较多叶片作为材料。植物组织培养技术可不受季节限制，利用少量植物组织，通过再生能获得大量植株，这一技术在报春苣苔属植物保育扩繁方面的研究结果陆续被报道。但不同植物的再生途径存在差异，如 Ma 等（2010）和 Yang 等（2012）以报春苣苔的叶片为外植体，通过诱导体胚和不定芽实现植株再生，付传明等（2015）以条叶唇柱苣苔的叶片为外植体，通过不定芽诱导途径获得了再生植株，闫海霞等（2017）以褐纹报春苣苔的叶片为外植体，通过不定芽和愈伤组织诱导两种途径建立了其组培快繁体系，何东平等（2024）通过叶片诱导不定芽，建立了寿城报春苣苔的离体再生技术，需针对不同植物探索其再生条件。截止目前，关于丹霞小花苣苔繁殖技术的研究，尚未见相关报道。

本研究以野生丹霞小花苣苔的叶片为材料，通过比较 $HgCl_2$ 不同消毒时间对叶片表面消毒效果的影响；研究不同浓度的植物生长调节剂配比对不定芽诱导和增殖的影响，筛选适宜不定芽诱导和增殖的培养基；最后观察和统计不同的生根培养基及不同移栽基质分别对组培苗生根和移栽驯化成活的影响，以筛选最佳生根培养基和移栽驯化栽培基质。旨在建立其组培快繁技术体系，实现其种质资源的保护、种群扩大及开发利用，为其他报春苣苔属植物的繁殖提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

经丹霞山管委会批准，在原生境地韶关仁化丹霞山（海拔 95 m，113°44′09.17″ E、25°01′36.85″ N）采集丹霞小花苣苔（*Primulina danxiaensis*）野生植株（图 1：A），后种植于韶关学院药用植物资源圃中（图 1：B）。待植株生长一段时间后，进行后续研究。

1.2 方法

1.2.1 材料的表面消毒

从韶关学院药用植物资源圃中剪取丹霞小花苣苔的叶片带回实验室，将剪取的叶片用洗衣粉浸泡 10 min，后用清水轻轻洗涤干净，再进行表面消毒。先用 75%酒精消毒 30 s，无菌水洗 3 次，再用 0.1% $HgCl_2$ 分别浸泡消毒 6、8、10 min，无菌水洗 4 次。后将叶片切成长×宽约为 0.8 cm × 0.8 cm（图 1：C）。接入 1/2MS+6-BA 0.5 $mg·L^{-1}$+NAA 0.1 $mg·L^{-1}$ 培养基中，15 d 后统计叶切片外植体褐化率、污染率，成活率，比较 0.1% $HgCl_2$ 不同消毒时间对叶片生长的影响。每个处理接种至少 30 个叶切片，重复 3 次。其中，褐化率（%）=褐化外植体数/接种外植体数×100（叶片褐化面积等于或小于 1/3），污染率(%)=污染外植体数/接种外植体数×100，外植体成活率（%）=成活外植体数/接种外植体数×100。

1.2.2 不定芽的诱导

采用 75%酒精 30 s+0.1% $HgCl_2$ 6 min 对叶片消毒后，以叶切片为外植体，参考欧明烛（2023）的方法，以 1/2MS 为基本培养基，设置不同植物生长调节剂组合，以下同此。分别为 6-BA（0.5、1、2 $mg·L^{-1}$）和 NAA（0.1、0.2、0.5 $mg·L^{-1}$）组合的 9 种不定芽诱导培养基。40 d 后统计不定芽诱导率和每个叶片芽数。每个处理接种至少 30 个叶切片，重复 3 次。其中，不定芽诱导率（%）=诱导出芽的外植体数/成活的外植体数×100，平均每片叶片的芽数=诱导出的芽数/有芽的叶片数。

1.2.3 不定芽的增殖

将诱导的不定芽（3~5 个为一丛）接入 6-BA（0.5、1、2 、3 $mg·L^{-1}$）与 NAA（0.05、0.1、0.2 $mg·L^{-1}$）组合，共 12 种芽增殖培养基上（基本培养基为 1/2MS），40 d 后统计不定芽的增殖情况，计算增殖系数。每个处理接种至少 30 丛芽，重复 3 次。其中，芽增殖系数=增殖后的总芽数/接种的芽数。

1.2.4 生根培养

将增殖的不定芽切分成单芽后分别转入 1/2MS 含有 NAA（0.1、0.3 和 0.5 $mg·L^{-1}$）的 3 种培养基中。30 d 后观察芽的生根情况，统计生根率和平均根数。每个处理接种至少 30 个芽苗，重复 3 次。其中，苗成活率（%）=成活的苗/接种的苗×100，生根率（%）=有根的苗/成活的苗×100，平均根数=生根总条数/成活的苗。

1.2.5 炼苗和移栽

将生根的组培苗移到正常室温下经过 7 d 炼苗，后移栽到 3 种不同的基质上，分别是喀斯特地貌的腐叶土+珍珠岩+蛭石（体积比 1:1:1），泥炭土+珍珠岩+蛭石（体积比 1:1:1），珍珠岩+蛭石（体积比 1:1）。统计移栽成活率和新叶长出率，比较不同的基质对组培苗移栽成活的影响。其中，移栽成活率（%）=成活的植株/移栽的植株×100，新叶长出率（%）=长出新叶的植株/成活的植株×100。

1.2.6 培养基的制备和培养条件

（1）培养基的制备

使用分析纯化学试剂配制 MS 培养基母液后再配制培养基。培养基中蔗糖为 30 g·L^{-1}, 琼脂粉为 7 g·L^{-1}，pH 5.8~6.0。然后在 121 ℃下灭菌 20 min 后备用。

（2）培养条件

不定芽诱导先暗处 10 d 后再移入光照培养。芽增殖、生根、移栽驯化阶段均在光照下培养，培养温度（25±1）°C、光照强度 1 500~2 000 lx、光照时间 12 h·d^{-1}。

1.3 数据统计分析

数据采用 Excel 软件整理，后输入到南京农业大学农学院王绍华编制的 STST 方差分析软件，采用单因素随机区组方法对结果进行方差分析（李春喜等，2023）。

2 结果与分析

2.1 $HgCl_2$ 消毒时间对丹霞小花苣苔叶片表面消毒效果的影响

以不同的 $HgCl_2$ 消毒时间对叶片进行表面消毒，将叶片接种到培养基上 10 d 后，观察到叶片存在轻度褐化和重度褐化情况。由表 1 可知，叶片的污染率，褐化率及成活率差异明显，其中污染率在 1.36~7.53%之间，褐化率在 9.68%~34.26%之间，成活率在 68.47%~84.95%之间。叶片消毒时间在 8~10min 时污染率下降，但褐化率升高，成活率降低，说明消毒时间大于 8 min 时，对外植体伤害较大。而 $HgCl_2$ 消毒时间为 6 min 时，褐化率最低为 9.68%，成活率最高为 84.95%，视为丹霞小花苣苔叶片表面消毒适宜的时间。

表 1 不同 $HgCl_2$ 消毒时间对叶片表面消毒效果的影响

Table 1 Effect of different disinfection time of $HgCl_2$ on disinfection effect of leaves surface

编号 No.	$HgCl_2$ 消毒时间 $HgCl_2$ disinfection time (min)	污染率 Pollution rate (%)	褐化率 Browning rate (%)	成活率 Survival rate (%)
1	6	7.53±1.86a	9.68±3.23b	84.95±3.72a
2	8	1.36±1.18b	13.68±3.00b	68.47±4.55b
3	10	5.27±0.94a	34.26±8.36a	71.09±6.09b

注：同列数据后不同小写字母表示存在统计学差异(P<0.05)，下同。以叶片褐化面积等于或小于 1/3 为轻度褐化计入褐化率，叶片褐化面积大于 2/3 为重度褐化按致死计算。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate statistical differences (P<0.05), the same below. The degree of leaf browning in *Primulina danxiaensis* can be divided into mild and severe, the mild browning with leaf browning area equal to or less than 1/3 is included in the browning rate, and severe browning with leaf browning area greater than 2/3 is calculated as lethal.

2.2 6-BA 与 NAA 组合对丹霞小花苣苔叶片不定芽诱导的影响

将丹霞小花苣苔的叶片接入到芽诱导培养基上（图 1：C），20 d 后发现叶片开始膨大，变厚，卷起（图 1：D），叶片的边缘或表面先产生芽点并有愈伤组织产生（图 2：A），30 d 后分化的不定芽逐渐长大（图 2：B）。由表 2 可知，9 种培养基上叶片不定芽诱导率无明显差异均能达到 100%，但叶片诱导的芽数有差异，平均在 21.34~38.35 之间。当 NAA 浓度一定，6-BA 浓度在 1~2 mg·L^{-1} 范围内，叶片诱导的平均芽数有随着 6-BA 浓度的升高而升高的趋势。其中，当 6-BA 浓度为 2 mg·L^{-1} 时不定芽诱导效果最好，每叶片诱导的平均芽数可达 32.23~38.35，显著高于其他处理且芽生长良好，无明显的玻璃化现象。以 6-BA 2 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1} 组合的培养基上，叶片诱导的平均芽数最多，达到 38.35，为适宜的丹霞小花苣苔叶片诱导不定芽的培养基。

表 2 不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合对叶片不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on adventitious bud induction of leaves

编号 No.	6-BA （mg·L^{-1}）	NAA （mg·L^{-1}）	芽诱导率 Adventitious bud induction rate (%)	平均每个叶片芽数 Average number of buds per leaf	生长情况 Growth situation
1	0.5	0.1	100	21.34±1.86d	不定芽大且多，长势好 Adventitious buds are large and numerous, showing good growth
2	0.5	0.2	100	25.66±1.44c	不定芽小且多，长势一般 Adventitious buds are small and numerous, showing average growth
3	0.5	0.5	100	21.58±1.90d	不定芽小且多，长势一般 Adventitious buds are small and numerous, showing average growth
4	1	0.1	100	23.48±2.03cd	不定芽大且多，长势一般 Adventitious buds are large and numerous, showing average growth
5	1	0.2	100	22.99±2.10cd	不定芽大且多，长势好 Adventitious buds are large and numerous, showing good growth
6	1	0.5	100	24.10±1.82cd	不定芽大且多，长势好 Adventitious buds are large and numerous, showing good growth
7	2	0.1	100	38.35±2.54a	不定芽大且多，长势好 Adventitious buds are large and numerous, showing good growth
8	2	0.2	100	32.23±2.26b	不定芽大且多，长势好 Adventitious buds are large and numerous, showing good growth
9	2	0.5	100	36.72±1.71a	不定芽大且多，长势好 Adventitious buds are large and numerous, showing good growth

2.3 6-BA 与 NAA 组合对丹霞小花苣苔不定芽增殖的影响

将叶片诱导的不定芽（每丛 3~5 个芽）接入到 12 种芽增殖培养基后，10 d 内观察到芽生长较慢，之后芽生长速度加快，20 d 后在芽的周围增殖出较多的不定芽（图 2：C）。由表 3 可知，12 种培养基上不定芽的增殖系数不同，芽增殖系数在 1.77~7.54 之间。当低浓度的 NAA（0.05~0.2 mg·L^{-1}）与低浓度 6-BA（0.5~1 mg·L^{-1}）组合时，芽增殖系数低且差异不明显；而当低浓度 NAA（0.05~0.2 mg·L^{-1}）与较高浓度 6-BA（2~3 mg·L^{-1}）组合时，芽增殖系数提高到 3.35~7.54，与其他培养基相比，差异明显。其中，以 6-BA 3 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1} 的培养基中芽增殖系数最高，为 7.54，并且芽生长良好，无明显玻璃化现象，为适宜丹霞小花苣苔不定芽增殖的培养基。综合得出，当 NAA 浓度为 0.05~0.2 mg·L^{-1}，6-BA 浓度在 1~3 mg·L^{-1} 时，芽的增殖系数会随着 6-BA 浓度的升高而升高。

表 3 不同浓度的 6-BA 和 NAA 组合对芽增殖的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on bud proliferation

编号 No.	6-BA （$mg \cdot L^{-1}$）	NAA （$mg \cdot L^{-1}$）	增殖系数 Proliferation coefficient	芽生长情况 Bud growth situation
1	0.5	0.05	2.55±0.09fg	不定芽增殖慢且小 Adventitious buds proliferate slowly and are relatively small
2	0.5	0.1	2.66±0.07f	不定芽增殖慢且小 Adventitious buds proliferate slowly and are relatively small
3	0.5	0.2	2.33±0.06fgh	不定芽增殖慢且小 Adventitious buds proliferate slowly and are relatively small
4	1	0.05	1.96±0.02gh	不定芽增殖慢且小 Adventitious buds proliferate slowly and are relatively small
5	1	0.1	1.77±0.04h	不定芽增殖慢且小 Adventitious buds proliferate slowly and are relatively small
6	1	0.2	1.99±0.02gh	不定芽增殖慢且小 Adventitious buds proliferate slowly and are relatively small
7	2	0.05	3.98±0.51d	不定芽增殖快且小 Adventitious buds proliferate rapidly and are relatively small
8	2	0.1	3.35±0.15e	不定芽增殖快且大 Adventitious buds proliferate rapidly and are relatively large
9	2	0.2	5.09±0.46c	不定芽增殖快且大 Adventitious buds proliferate rapidly and are relatively large
10	3	0.05	6.68±0.63b	不定芽增殖快且大 Adventitious buds proliferate rapidly and are relatively large
11	3	0.1	7.28±0.33a	不定芽增殖快且大 Adventitious buds proliferate rapidly and are relatively large
12	3	0.2	7.54±0.57a	不定芽增殖快且大 Adventitious buds proliferate rapidly and are relatively large









A. 原生境的丹霞小花苣苔（Bar=1 cm）；**B**. 引种在温室大棚的丹霞小花苣苔野生植株（Bar=1 cm）；**C**. 叶片接种到芽诱导培养基上；**D**. 叶片发生膨大、变厚、卷起。

A. *Primulina danxiaensis* in its original habitat (Bar=1 cm); **B**. *P. danxiaensis* was introduced into greenhouses from the wild (Bar=1 cm); **C**. Leaves were inoculated on bud induction medium; **D**. Leaves became swollen, thickened and rolled up.

图 1 丹霞小花苣苔的来源及叶片接种培养

Fig.1 The source and leaf inoculation culture of *Primulina danxiaensis*

2.4 不同的生根培养基及栽培基质分别对组培苗生根和移栽成活的影响

将增殖的健壮不定芽接入到生根培养基上后，发现不定芽生长良好，20 d 左右观察到不定芽基部有不定根出现。由表 4 可知，3 种生根培养基上苗成活率和生根率差异不明显，均能达到 100%。但苗的平均根数随着 NAA 浓度的升高而明显升高，在 22.41~26.28 之间，根的外观为纤细，长度在 0.5~2 cm。综合对比，以 1/2MS+NAA 0.5 mg·L^{-1} 为合适生根培养基(图 2：D)。

选取生根状况良好的组培苗，经过炼苗处理后，将其移栽至基质上进行驯化（图 2：E）。从 30 d 后统计移栽成活率看出，生根的组培苗移栽到 3 种基质后，组培苗成活率均可高达 100%，97.78% 以上的植株长出了新叶，生长良好（表 5）。移栽到 3 种基质中的组培苗外观无明显差异，说明喀斯特地貌的腐叶土+珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1:1），泥炭土+珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1:1）和珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1）3 种基质均适合丹霞小花苣苔组培苗的移栽。

表 4 不同的培养基对不定芽生根的影响

Table 4 Effects of different media on rooting of adventitious buds

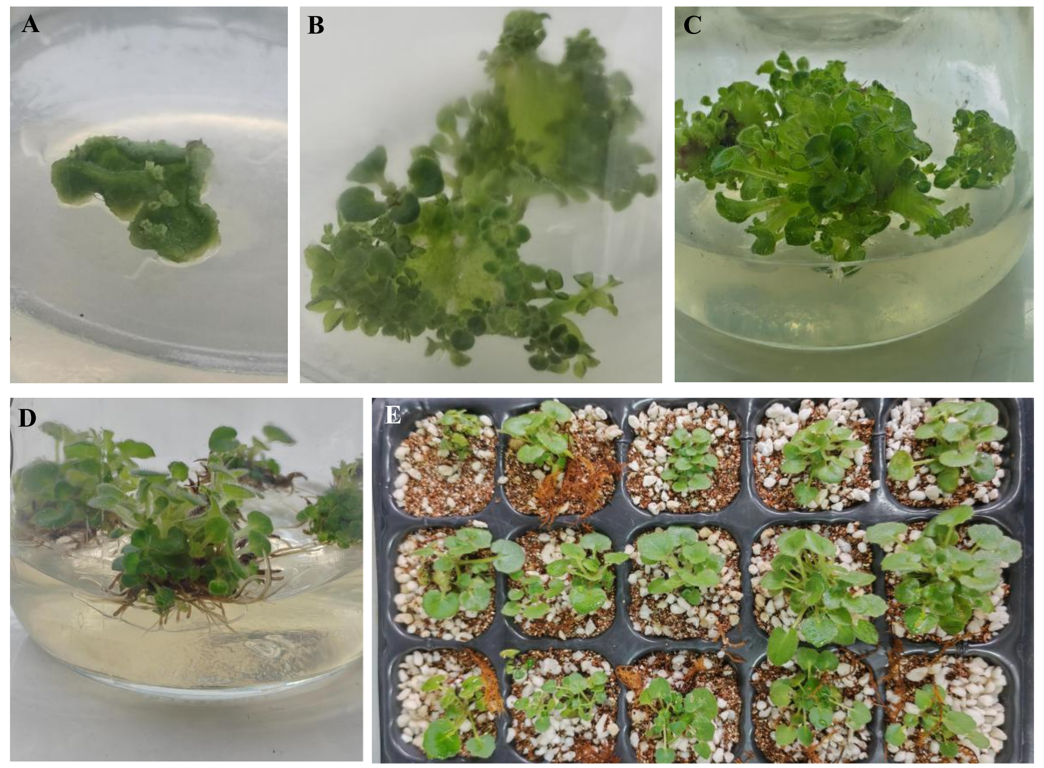
编号 No.	NAA（mg·L^{-1}）	苗成活率 Survival rate of seedlings (%)	生根率 Rooting rate (%)	平均根数 Average number of roots	根的长度 Length of root（cm）
1	0.1	100	100	22.41±2.14b	0.5~2
2	0.3	100	100	25.42±1.68a	0.5~2
3	0.5	100	100	26.28±1.65a	0.5~2

表 5 生根的组培苗移栽

Table 5 Transplantation of rooted tissue culture seedlings

编号 No.	栽培基质 Cultivation medium	移栽成活率 Survival rate of transplanting (%)	新叶长出率 Rate of new leaf growth (%)	生长情况 Growth situation
1	喀斯特地貌的腐叶土+珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1:1） Leaf mould of Karst landform+pearlite+vermiculite	100	100a	生长良好 Growing well

	(1:1:1，*V*/*V*/*V*)			
2	泥炭+珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1:1） Peat+earlite+vermiculite (1:1:1，*V*/*V*/*V*)	100	97.78±1.92a	生长良好 Growing well
3	珍珠岩+蛭石（体积比为 1:1） Earlite+vermiculite (1:1，*V*/*V*)	100	100a	生长良好 Growing well



A. 叶肉细胞分化出芽点；**B**. 分化的不定芽长大；**C**. 不定芽增殖；**D**. 不定芽生根；**E**. 生根的组培苗移栽后生长良好。

A. Bud points were differentiated from the mesophyll cells; **B**. Differentiated adventitious buds had increased in size; **C**. Adventitious bud proliferation; **D**. Adventitious bud rooting; **E**. Tissue-cultured seedlings with roots grow well after being transplanted.

图 2 丹霞小花苣苔叶片不定芽的诱导及植株再生

Fig. 2 Adventitious bud induction and plant regeneration from leaves of *Primulina danxiaensis*

3 讨论与结论

3.1 外植体的处理和表面消毒

外植体表面处理和消毒是能否成功建立快繁技术体系的第一步。苦苣苔科植物叶片通常采用75%酒精+0.1% $HgCl_2$ 组合进行表面消毒，但不同植物消毒的技术流程不同。杨晨星（2020）研究使用 75%酒精消毒 30 s+0.1% $HgCl_2$ 浸泡 10 min 对大岩桐叶片消毒效果最好。张雪莲（2018）则发现短茎半蒴苣苔叶片用 0.1% $HgCl_2$ 消毒 9 min 效果最好。而本研究使用 6~10 min 的 0.1% $HgCl_2$ 对丹霞小花苣苔叶片进行表面消毒，通过综合考量污染率，褐化率及成活率之间的平衡关系，得出 6 min 为叶片合适的表面消毒时间，表明丹霞小花苣苔叶片的消毒无需太长时间。这与欧明烛（2023）使用 75%酒精消毒 20 s+0.1% $HgCl_2$ 对辐花苣苔的叶片短时间消毒 5 min 成活率较高的研究结果相似，但需要注意的是，辐花苣苔的叶片在消毒前需用流水冲洗 30 min，而丹霞小花苣苔的叶片则不能用流水冲洗，仅用清水轻轻洗涤 10 min 左右即可。若用流水冲洗丹霞小花苣苔的叶片，会导致接种的叶片发白或变褐，进而影响外植体的正常生长，这可能与丹霞小花苣苔叶片较嫩且薄，流水冲洗会

损伤其叶肉细胞有关，这一点可为苦苣苔植物叶片前期清洗处理提供借鉴。本研究还发现，随着 0.1% $HgCl_2$ 消毒时间的延长，污染率并不总是呈现下降趋势，如有时会出现消毒 10 min 的叶片污染率高于消毒 8 min 的情况，这可能与叶片的内生菌和不同批次取材的叶片有关。

3.2 叶片的分化与不定芽诱导

植物生长调节剂种类和浓度对苣苔科植物的叶片分化和植株再生有着重要影响。Chen 等（2016）发现，钟冠唇柱苣苔的叶片在单独使用 6-BA 的培养基上，能直接再生出不定芽，而在 6-BA+NAA 两者组合的培养基上，则产生愈伤组织。Ouyang 等（2016）则发现，单座苣苔叶片在单独使用 6-BA（1.13~2.25 mg·L^{-1}）或 6-BA 5.63 mg·L^{-1} 培养基上，能同时产生不定芽和体胚。与上述结果不同的是，本研究发现丹霞小花苣苔的叶片在 6-BA+NAA 两者组合的培养基上，直接再生不定芽，这与闫海霞等（2019b）发现贵港报春苣苔叶片在 6-BA+IAA 组合的培养基上能直接再生的结果相似，二者均需适宜的细胞分裂素和生长素配合调控叶片直接再生。可见，不同种苦苣苔科植物的叶片再生对植物生长调节剂需求不同，不同的植物生长调节剂可调控叶片产生不同的再生途径，出现这些差异的原因除了与叶片自身的差异有关外，可能与植物内源激素的含量和种类有关（陈劲枫和张俊莲，2022）。研究还发现不同浓度的 6-BA（0.5~2 mg·L^{-1}）+NAA 组合的培养基上，丹霞小花苣苔每个叶片的芽数存在明显差异，以较高浓度的 6-BA 2 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1} 组合的培养基芽数最多，闫海霞等（2018，2019b）同样发现较高浓度的 6-BA 4.5 mg·L^{-1}+NAA 0.03 mg·L^{-1} 组合的培养基上黄花牛耳朵叶片诱导的芽数最多，4 mg·L^{-1}+ IAA 1.5 mg·L^{-1} 组合的培养基上贵港报春苣苔叶片诱导的芽数最多，可见，一定范围内较高浓度的细胞分裂素和生长素组合，提高了叶片诱导的芽数，可能是较高浓度的 6-BA 与适当浓度的生长素组合提高了苦苣苔科植物叶片不定芽分化的能力。

3.3 不定芽的增殖

苦苣苔科植物不定芽的增殖能力是决定其能否实现大规模繁殖及有效开发利用的关键因素，为促进芽的增殖，培养基中常添加不同浓度和种类的细胞分裂素与生长素配比。Wang 等（2018）研究发现，弥勒苣苔的不定芽在低浓度的 6-BA 1 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1} 组合的培养基上增殖较好。Li 等（2013）研究发现含低浓度 6-BA 0.5 mg·L^{-1} 或含低浓度 6-BA 0.5 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1} 的培养基较适合齿叶吊石苣苔不定芽的增殖。与上述研究结果不同的是，本研究发现丹霞小花苣苔不定芽在低浓度的 6-BA（0.5~1 mg·L^{-1}）与 NAA 组合芽增殖系数较低，较高浓度的 6-BA（2~3 mg·L^{-1}）与 NAA 组合促进了芽的增殖，具体为 6-BA 3 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1} 组合的培养基为适合丹霞小花苣苔不定芽的增殖。这一发现与刘伟和黄勇（2010）关于吊石苣苔的不定芽增殖的研究结果相一致，同样发现使用较高浓度的 6-BA 3 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1} 组合的培养基能促进不定芽增殖。上述结果发现，在不定芽增殖阶段，不同苦苣苔科植物所需的细胞分裂素和生长素的比例不同，产生这种差异的原因除与植物种类和基因型有关外，还与对植物生长调节剂的敏感度不同有关（逯锦春等，2022；武晓云等，2024）。

3.4 生根

在苦苣苔科植物组培苗的生根阶段，通常选择 MS 或 1/2MS 为基础培养基，并添加不同浓度和种类的 NAA、IBA 或 IAA 以优化生根效果。Li 等（2013）研究发现，齿叶吊石苣苔不定芽在含有 0.5 mg·L^{-1} IBA、IAA 或 NAA 的 MS 培养基上生根最好，而本研究发现单独使用低浓度 NAA 即能使丹霞小花苣苔组培苗生根，其中不定芽在含有 0.1~0.5 mg·L^{-1} NAA 的 1/2MS 培养基上生根率无明显差异，均能达到 100%，这为简化苦苣苔科植物组培苗生根提供参考，但随着生长素 NAA 浓度的升高其生根条数明显提高，这一结果与闫海霞等（2018）在黄花牛耳朵不定芽以及杨晨星（2020）在非洲紫罗兰不定芽生根培养上的研究结果相似，这说明一定范围内生长素浓度 NAA 的升高，有显著促进苦苣苔科植物组培苗的生根的作用，原因可能是适宜浓度的生长素促进了根原基细胞分裂和伸长，表现为生根条数增加（江玲和周燮，2000）。

3.5 栽培基质

栽培基质的选择对于组培苗的成活率至关重要。张琳娜等（2018）研究表明当珍珠岩、蛭石与

腐殖质草炭混合时，弥勒苣苔组培苗移栽成活率可达到 100%。而李谦盛等（2016）的研究发现，珍珠岩和蛭石是否添加腐殖质草炭，牛耳朵的组培苗均能达到 100%移栽成活率。本研究中，丹霞小花苣苔组培苗在珍珠岩+蛭石是否添加有腐殖质喀斯特地貌的腐叶土或泥炭土基质上均表现出良好的生长状态，移栽成活率达到 100%，这一结果与李谦盛等（2016）的研究结果有相似之处，可能与丹霞小花苣苔的生境有关。该植物生长在岩石的裂缝中，土层较薄，可能更依赖于土壤的湿度和透气性，而对土壤有机质的含量要求相对较低。因此，在移栽丹霞小花苣苔组培苗时，可选择上述三种基质中的任一种。

综上所述，本研究以丹霞小花苣苔的叶切片作为外植体，探究了 $HgCl_2$ 表面消毒时间及植物生长调节剂对其不定芽诱导、芽增殖及生根培养的具体影响，对比了组培苗在不同移栽基质中的生长表现，并据此成功建立了丹霞小花苣苔的离体培养和植株再生体系。这一技术体系为丹霞小花苣苔提供了一种有效的无性繁殖方法，能够大量繁殖该物种，从而为丹霞小花苣苔的开发与利用提供了技术支撑。

参考文献：

CHEN JF, ZHANG JL, 2022. Plant tissue culture: The Third Edition [M]. Beijing: China Agriculture Press: 49-51. [陈劲枫，张俊莲，2022. 植物组织培养：第三版 [M]. 北京：中国农业出版社：49-51.]

CHEN SF, GUO W, CHEN ZX, et al., 2021. Strong genetic structure observed in *Primulina danxiaensis*, a small herb endemic to Mount Danxia with extremely small populations [J]. Frontiers in Genetics, 12: 722149.

CHEN YL, ZHANG YY, CHENG QW, et al., 2016. Plant regeneration via direct and callus-mediated organogenesis from leaf explants of *Chirita swinglei* (Merr.) W. T. Wang [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52: 521-529.

FU CM，XIAN KH，HE JX，et al., 2015. Rapid propagation technique of *Chirita ophiopogoides in vitro* [J]. Seed，34(4): 118-122.［付传明，冼康华，何金祥，等，2015. 条叶唇柱苣苔离体快繁技术研究 [J]. 种子，34(4)：118-122.］

HE DP, DUAN DW, XU B, et al., 2024. Adventitious bud induction and plant regeneration of detached leaves from *Primulina shouchengensis* (Z.Yu Li) Z.Yu Li [J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-16 [2024-03-21]. https://link.cnki.net/ur lid/46.1068.s.20240320.1912.017. [何东平，段登文，许彬，等，2024. 寿城报春苣苔离体叶片不定芽的诱导及植株再生 [J/OL]. 分子植物育种：1-16 [2024-03-21]. https://link.cnki.net/ur lid/46.1068.s.20240320.1912.017.]

JIANG L, ZHOU X, 2000. The effect of auxins and cytokinins on the formation of lateral root primordia and the contents of endogenous hormones in lettuce seedlings [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 23(1): 19-22. [江玲，周燮，2000. 外源生长素和细胞分裂素对莴苣幼苗侧根原基发生和内源激素含量的影响 [J]. 南京农业大学学报，23(1)：19-22.]

LI CX, JIANG LN, SHAO Y, et al., 2023. Biostatistics[M]. 6th ed. Beijing: Science Press: 237-240. [李春喜，姜丽娜，邵云，等，2023. 生物统计学 [M]. 6 版. 北京：科学出版社：237-240.]

LI QS, DENG M, ZHANG J, et al., 2013. Shoot organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Lysionotus serratus* D. Don [J]. The Scientific World Journal, 2013: 280384.

LI QS, FAN XL, FANG J, et al., 2016. Experiment on the formula of growth media for *Chirita eburnean* tissue culture plantlet transplant [J]. Journal of Shanghai Institute of Technology (Natural Science), 16(2): 184-188. [李谦盛，樊晓亮，方俊，等，2016. 牛耳朵组培苗驯化移栽基质配方试验 [J]. 上海应用技术学院学报（自然科学版），16(2)：184-188.]

LIU W, HUANG Y, 2010. Tissue culture and rapid propagation of *Lysionotus pauciflorus* Maxim [J]. Plant Physiology Communications, 46(2): 159-160. [刘伟，黄勇，2010. 吊石苣苔的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯，46(2)：159-160.]

LU JC, CAO LN, TONG GJ, et al., 2022. Establishment of callus induction and regeneration system of *Anemone silvestris* [J]. Chinese Bulletin of Botany, 57(2), 217-226. [逯锦春，曹丽娜，佟冠杰，等，2022. 大花银莲花愈伤组织诱导及再生体系的建立 [J]. 植物学报，57(2)：217-226.]

LUO P, DENG ZS, WANG JJ, et al., 2023. Chemical constituents from *Primulina linearifolia* (W. T. Wang) Yin Z. Wang [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(5): 883-890. [罗彭，邓祖帅，王佳佳，等，2023. 线叶报春苣苔化学成分研究 [J]. 广西科学，30(5)：883-890.]

MA GH, HE CX, REN H, et al., 2010. Direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum* [J]. Biologia Plantarum, 54 (2): 361-365.

MA HS, WEN SJ, PAN B, et al., 2025. *Primulina gemella*, a newly recorded species of Gesneriaceae in China [J/OL]. Journal of Plant Resources and Environment: 1-5[2025-01-14]. https://link.cnki.net/urlid/32.1339.S.20250113.1439.006. [马虎生，文淑均，盘波，等，2025. 苦苣苔科一中国新记录种——匍枝报春苣苔 [J/OL]. 植物资源与环境学报：1-5[2025-01-14]. https://link.cnki.net/urlid/32.1339.S.20250113.1439.006.]

NING ZL, 2017. Systematic taxonomyand resource conservation on the *Primulina* hance (Gesneriaceae) [D]. Guangzhou: South China Agricultural University: 72-95. [宁祖林，2017. 报春苣苔属（苦苣苔科）系统分类学及其资源保育研究 [D]. 广州：华南农业大学：72-95.]

OU MZ, 2023. Research on the endangered reasons and *in vitro* cultivation techniques of the extremely narrow region endemic plant, *Oreocharis esquirolii* [D]. Guiyang: Guizhou University: 52-53. [欧明烛，2023. 极狭域特有植物辐花苣苔濒危原因及离体培育技术研究 [D]. 贵阳：贵州大学：52-53.]

OUYANG Y, CHEN YL, LÜ JF, et al., 2016. Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in *Metabriggsia ovalifolia* W. T. Wang [J]. Scientific Reports, 6: 24662.

QI HS, HUANG S, WANG JF, et al., 2018. Screening of leaf cuttage propagation methods for *Chirita heterotricha* [J]. Molecular Plant Breeding, 16(2): 535-540. [戚华沙，黄赛，王景飞，等，2018. 烟叶唇柱苣苔叶片扦插繁殖方法的筛选 [J]. 分子植物育种，16(2)：535-540.]

SHEN RJ, LIN SS, YU Y, et al., 2010. *Chiritopsis danxiaensis* sp. nov. (Gesneriaceae) from Mount Danxiashan, south China [J]. Nordic Journal of Botany, 28: 728-732.

TIAN J, KONG XL, DU Q, et al., 2014. Three newly recorded species of *Primulina* (Gesneriaceae) from Jiangxi province [J]. Jiangxi Forestry Science and Technology, 42(1): 37-38. [田径，孔小丽，杜强，等，2014. 江西报春苣苔属(苦苣苔科)3 新纪录种 [J]. 江西林业科技，42(1)：37-38.]

WANG DD, LI XH, CHENG ZY, et al., 2018. *In vitro* preservation and micropropagation of *Oreocharis mileense* (W. T. Wang) M. Möller & A. Weber (Gesneriaceae) through shoot organogenesis [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 54: 606-611.

WANG N, HU CY, XIAO PG, et al., 2023. Investigation on traditional pharmacology of the Gesneriaceae in China [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 46(12): 2975-2979. [王宁，胡彩云，肖培根，等，2023. 国产苦苣苔科植物传统药物学调查 [J]. 中药材，46(12)：2975-2979.]

WANG YZ, MAO RB, LIU Y, et al., 2011. Phylogenetic reconstruction of *Chirita* and *allies* (Gesneriaceae) with taxonomic treatments [J]. Journal of Systematics and Evolution, 49(1): 50-64.

WEBER A, MIDDLETON DJ, FORREST A, et al., 2011. Molecular systematics and remodelling of *Chirita* and associated genera (Gesneriaceae) [J]. Taxon, 60(3): 767-790.

WU XY, LIAO ML, LI XR, et al., 2024. Establishment of regeneration system of *Chrysanthemum vestitum* with three floret forms [J]. Chinese Bulletin of Botany, 59(2): 245-256. [武晓云，廖敏凌，李雪茹，等，2024. 毛华菊 3 种瓣型株系再生体系的建立 [J]. 植物学报，59(2)：245-256.]

YAN HX, DENG JL, HUANG CY, et al., 2017. Tissue culture and rapid propagation of *Primulina glandaceistriata* [J]. Guihaia, 37(10): 1270-1278. [闫海霞，邓杰玲，黄昌艳，等，2017. 褐纹报春

苣苔组织培养与快速繁殖 [J]. 广西植物，37(10)：1270-1278.]
YAN HX, GUAN SK, DENG JL, et al., 2018. Adventitious bud induction and plant regeneration of detached leaves from *Primulina lutea* Yan Liu & Y. G. Wei [J]. Molecular Plant Breeding, 16(1): 211-216. [闫海霞，关世凯，邓杰玲，等，2018. 黄花牛耳朵离体叶片不定芽的诱导及植株再生 [J]. 分子植物育种，16(1)：211-216.]
YAN HX, GUAN SK, ZHOU JY, et al., 2019a. Optimization of factors affecting cutting of *Primulina macrorhiza*（D. Fang & D. H. Qin）Mich. Möller & A.Weber based on orthogonal experiment [J]. Journal of Southern Agriculture, 50(11): 2519-2524. [闫海霞，关世凯，周锦业，等，2019a. 基于正交试验的大根报春苣苔扦插影响因素优化 [J]. 南方农业学报，50(11)：2519-2524.]
YAN HX, GUAN SK, ZHOU JY, et al., 2020. Effects of different plant growth regulators, leaf positions and substrate components on propagation of three species of *Primulina* [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 33(1): 126-134. [闫海霞，关世凯，周锦业，等，2020. 不同植物生长调节剂、叶片部位及基质组分对报春苣苔叶插繁殖的影响 [J]. 西南农业学报，33(1)：126-134.]
YAN HX, HUANG CY, ZHANG ZB, et al., 2019b. Tissue culture and plant regeneration of leaves of *Primulina guigangensis* [J]. Chinese Journal Tropical Crops, 40(1): 98-106. [闫海霞，黄昌艳，张自斌，等，2019b. 贵港报春苣苔的叶片组培与植株再生 [J]. 热带作物学报，40(1)：98-106.]
YANG CX, 2020. Tissue culture and application of two ornamental plants of *Gesneriaceae* [D]. Harbin: Northeast Forestry University: 7-26. [杨晨星，2020. 2 种苦苣苔科观赏植物组织培养及应用 [D]. 哈尔滨：东北林业大学：7-26.]
YANG XY, LÜ JF, TEIXEIRA DA SILVA JA, et al., 2012. Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum* [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 109: 213-221.
ZHANG GZ, YU XL, 2012. *Chiritopsis* W. T. WANG: a newly recorded genus of Gesneriaceae from Hunan Province [J]. Journal Central South University of Forestry & Technology, 32(6): 135-137. [张贵志，喻勋林，2012. 湖南苦苣苔科一新纪录属——小花苣苔属 [J]. 中南林业科技大学学报，32(6)：135-137.]
ZHANG LN, HE J, ZHANG X, et al., 2018. Root induction and matrix optimization of *Paraisometrum mileense* tissue culture seedling [J]. Journal of West China Forestry Science, 47(4): 69-73. [张琳娜，何俊，张翔，等，2018. 弥勒苣苔组培苗生根及移栽基质的筛选 [J]. 西部林业科学，47(4)：69-73.]
ZHANG XL, 2018. Study on micropropagation technique of rare and wild plant with extremely small population [D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering: 57-61. [张雪莲，2018. 几种珍稀及极小种群野生植物的组织培养技术研究 [D]. 广州：仲恺农业工程学院：57-61.]